

Szakmai zárójelentés

A pályázat célja a biológiai membránok fizikai tulajdonságainak vizsgálata volt, különös tekintettel a töltéseloszlás és - ezzel összefüggésben - az elektromos térszerkezet funkcionális szerepére. Modellobjektumunk a protonpumpáló bakteriorodopszin (bR) fehérjét kristályos rendben tartalmazó szupramolekuláris struktúra („sejtszervecske”), a bíbormembrán, célunk pedig általános membrán- és fehérjebiofizikai következtetések levonása. Kutatásainkat és a velük kapcsolatos módszertani fejlesztőmunkát három téma köré csoportosítottuk.

1. A molekulán belüli elektromos töltéseloszlás funkcionális leírása

A membránon belüli töltésmozgások detektálására általunk kidolgozott módszer segítségével meghatároztuk az elektromos dipólmomentum megváltozását az ionpumpáló membránfehérjék prototípusának tekinthető bakteriorodopszin (bR) fotoelektromos jeleiből, a molekula gerjesztését követő mikroszekundumos időskálán. Az eredményeket összevetettük a szakirodalomban publikált röntgendiffrakciós szerkezetekből számolható hasonló mennyiséggel. Míg egy szerkezet esetében jó egyezést tapasztaltunk, másik két röntgendiffrakciós struktúra nem volt összeegyeztethető kísérleti eredményeinkkel.

A későbbiekben az összehasonlítást kiterjesztettük a 10-100 us-os időtartományra. Ezen a skálán - a korábbiakkal szemben - már a bR „aktív centrumát” képező retinál kromofor deprotonálódásához kapcsolható, nagyobb protonmozgások dominálnak.

Kihasználva a bR fotociklusának fénnyel történő „programozhatóságát”, vagyis azt a tényt, hogy a protontranszport lépéseihez rendelhető reakcióciklus (a „fotociklus”) kvázistabil konformációs állapotaiból a fehérje – alkalmas gerjesztés segítségével visszahajtható az alapállapotba, kettős gerjesztéses kísérleteket is végeztünk. Az alapállapot impulzusszerű gerjesztésével elindítottuk a fotociklust, majd az „L” és „M” konformereket – megfelelő hullámhosszú és időzítésű fényimpulzusok segítségével – visszahajtottuk az alapállapotba. A detektált elektromos jeleket az így „rövidre zárt”, egyszerűsített fotociklus alapján - a szakirodalomban közzétett szerkezetvizsgálati eredményekből kiinduló molekuladinamikai számításaink segítségével - értelmeztük.

Utóbbi számításokat a molekulához erősebben vagy lazábban kötött vízmolekulák figyelembevételével végeztük úgy, hogy a szerkezetek egyensúlyi fluktuációiból adódó átlagértékeket tekintettük az összehasonlítás alapjának. Az eddigieknél pontosabb adatok alapján figyelemreméltó egyezést tapasztaltunk az egyik szerkezetvizsgáló labor (Kouyama és mtsi.) adatai alapján számolt, és a fotoelektromos jelek kiértékelése után kapott dipólértékek között a molekuláris reakcióciklus K, L, M₁ és M₂ intermedierjeire. Eredményeink alapján új fizikai modellhipotézist állítottunk fel a bR működésére vonatkozóan. Eszerint a pumpafolyamat szigorúan egymást követő protontranszfer és fehérjelerelaxációs lépések sorozatának tekinthető.

A munka jelentősége – megítélésünk szerint - kettős. Egyrészt megmutattuk, hogy módszerünk a molekula működését kísérő szerkezetváltozásokat érzékenyen jellemezi, és mint ilyen, alkalmas - más kísérleti vagy elméleti úton meghatározott - molekuláris köztesállapotok szerkezeti validálására, másrészt az összehasonlítás lehetőséget teremt az elektromos töltésátrendeződések funkcionális értelmezésére.

Publikációk

A) meghívott előadások:

A. Dér: “How can photoelectric signals of bacteriorhodopsin help to test intermediate structures?”

Symposium on Structure and Function of Retinal Proteins, Heidelberg, 2005.

A. Dér: “Electric signals to reveal ion pump function”

Sofia School for Protein Science (EBSA), Sofia, 2006

A. Dér: “Molecular Mechanisms of Retinal Protein Action: A Combination of Experimental and Theoretical Approaches”

International Symposium of Retinal Proteins, 2007 Sept. 23-26, Bremen

A. Dér: “What do electric signals tell us about bacteriorhodopsin function?”

13th International Conference on Retinal Proteins, 2008 June 15-19, Barcelona

B) cikkek:

Rudolf Tóth-Boconádi, András Dér, Stefka G. Taneva and Lajos Keszthelyi

Excitation of the L intermediate of bacteriorhodopsin: Electric responses to test X-ray structures

Biophysical Journal 90 (7): 2651-2655 (2006)

R. Tóth-Boconádi, S.G. Taneva, L. Fábián, A. Dér and L. Keszthelyi:
pH-dependence of the photoelectric response of the M intermediate of bacteriorhodopsin

The Journal of Biological Physics and Chemistry 7: 147–151 (2007).

R. Tóth-Boconádi, A. Dér, L. Fábián, S. G. Taneva and L. Keszthelyi:

Excitation of the M intermediates of wild-type bacteriorhodopsin

Photochemistry and Photobiology 85: 609-613 (2009)

R. Tóth-Boconádi, S. G. Taneva, L. Fábián, A. Dér, and L. Keszthelyi:
pH-dependence of the photoelectric response of the M intermediate of bacteriorhodopsin
J. Mol. Struct. (közlésre benyújtva)

2. A határfelületi vízréteg szerepe a fehérjék szerkezetében és működésében

További kísérleteink segítségével a (biológiai) határfelületeken fellépő kölcsönhatásoknak a víz szerkezetével összefüggő komponensét kezdtük tanulmányozni. E munkánknak során támaszkodunk korábbi OTKA-pályázatunk Hofmeister-effektussal kapcsolatos kutatási eredményeire is.

A szakirodalomban fellelhető számos kísérleti adat valamint saját méréseink alapján megmutattuk, hogy a semleges sók anionjainak tulajdonított Hofmeister-effektusok a fehérje-víz határfelületi réteg szerkezetváltozásaival magyarázhatók. FTIR kísérletekkel kimutattuk a vízmolekulák közti H-kötések erősségének anionfüggő változását, ami számot ad a határfelületi feszültség kohéziós járulékáról. Megmutattuk, hogy a konformációváltozások során exponált vagy okkludált fehérjefelületek aminosav-összetételének függvényében a fehérjekonformációk három csoportra oszthatók. A két ritkábban előforduló konformációt esettanulmányokon (bR és myoglobin) keresztül, spektroszkópai és kalorimetriás mérések segítségével demonstráltuk.

A Hofmeister-effektus fenomenologikus értelmezését megadó elméleti modellünk kísérletileg ellenőrizhető következményeit vizsgáltuk atomerőmikroszkópia (AFM) segítségével. Megállapítottunk, hogy az anionok erő-távolság karakterisztikára gyakorolt hatása összhangban áll a víz-fehérje határfelületi feszültségnek a Hofmeister-hatásban betöltött központi szerepét hangsúlyozó hipotézisünkkel.

Az egyik kísérletsorozat során mind a pásztázó tűt (SiN), mind pedig a tárgyfelületet (csillámkristály) vékony aranyréteggel vontuk be, amelyre diszulfid kötésekkel kapcsolódó tiol-filmet vittünk fel. A tiolrétegek terminális csoportjának alkalmas megválasztásával biomimetikus hidrofób és hidrofíl felszíneket kaptunk. Az ezek között vizes közegben fellépő "non-kontakt" kölcsönhatásokat (kozmotrop és kaotrop sóoldatok esetén) mértük, és a vizes fázis - felülethez közeli - szerkezetének megváltozása alapján értelmeztük.

Megállapítottuk, hogy az AFM méréseknél használt szilárd felületeken önálló másodlagos szerkezettel nem rendelkező fehérjékből ("Intrinsically unstructured proteins") is homogén, monomolekuláris vastagságú filmek készíthetők, amelyeken az előző bekezdésben leírtakhoz hasonló méréseket végeztünk.

Az eredmények egyrészt felhívják a figyelmet a biomolekulákat közvetlenül körülvevő vízréteg fiziológiai fontosságára, másrészt az itt fellépő fizikai kölcsönhatások jobb megértése a gyakorlati alkalmazások szempontjából is fontos. A bioelektronika egyik alapproblémája ugyanis a biológiai anyag és a szilárd fázis közötti kapcsolatot biztosító alkalmas határréteg létrehozása.

Publikációk:

A) meghívott előadások

Dér A.: "Hogyan befolyásolja a fehérjekonformációt a víz szerkezete?"

Straub-napok, 2005. november 16-18, Szeged

A. Dér: “Water environment controls proton pumping of bacteriorhodopsin”
Symposium on Structure and Function of Retinal Proteins, Heidelberg, 2007.

A. Dér:
Salts, interfacial water and protein conformation
Sofia School for Protein Science (EBSA), Sofia, 2007

B) cikkek

A. Dér, L. Kelemen, L. Fábián, S. G. Taneva, E. Fodor, T. Páli, A. Cupane,
M. G. Cacace, and J. J. Ramsden:
Interfacial water structure controls protein conformation
J. Phys. Chem. B, 111: 5344-5350 (2007)

A. Dér:
Salts, interfacial water and protein conformation
Biotechnology & Biotechnological Equipment (2008) 22 : 629-633

3. A bR nemlineáris optikai tulajdonságainak jellemzése

Eredeti célkitűzéseink között szerepelt integrált optikai módszerek felhasználása az intramembrán elektromos folyamatok jellemzésére. Egy intézetünkben korábban kidolgozott módszer segítségével üveghordozó felületen - fotopolimerizációs eljárással - miniatűr hullámvezető csíkokat készítettünk. Megmutattuk, hogy az ezekből felépített integrált optikai struktúrák (pl. Mach-Zehnder interferométer) segítségével az eddigieknél érzékenyebben tudjuk detektálni a bR molekula retinál kromoforja közelében - a lokális elektromos tér változásai következtében – fellépő abszorpció- és törésmutató-változásokat. Mérési elrendezésünk segítségével megmutattuk, hogy a bR molekula gerjesztését követő gyors spektrális változások alkalmasak ns-os fényimpulzusok modulálására.

A lehetséges gyakorlati alkalmazásokra való tekintettel átfogó kísérletsorozatot végeztünk szárított bR-t tartalmazó vékony filmrétegek optikai tulajdonságainak vizsgálatára. Megállapítottuk, hogy a kinetikai változások két független fotociklus jelenlétével magyarázhatók, amelyek súlyaránya a relatív páratartalom függvénye. Az eredmények molekuláris értelmezését a bR molekula által kötött víz mennyiségére alapoztuk. Mérési eredményeinkre alapozva, eljárást dolgoztunk ki integrált optikai bioszenzorok kalibrálására, bakteriorodopszin-alapú fényérzékeny vékonyréteg alkalmazásával.

Tudományos eredményeink és módszertani fejlesztéseink középtávú alkalmazására számítunk az optoelektronikában és a bioszenzorikában.

Publikációk:

A) meghívott előadások

A. Dér: “Integrated optical switching based on the protein bacteriorhodopsin”
Cranfield University, UK, 2005

Dér A., Fábián L., Valkai S., Ormos P: “Az integrált optika biofizikai alkalmazásai”
Eötvös Loránd Fizikai Társulat, Tavaszi Iskola, Balatonfüred, 2005

A. Dér: “Optoelectrical application of proteins”
Meeting of COST Action 0604 (“Optical Micro-Manipulation by Nonlinear Nanophotonics”), Brussels, Belgium, 2007

A. Dér: “Protein-based integrated optical switching”
16th PCS Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics,
8-12 September, Polanica Zdrój, Poland, 2008

B) cikkek

Dér A., Fábián L., Valkai S., Ormos P.:
Az integrált optika biofizikai alkalmazásai (könyvfejezet)
"A kvantumoptika és -elektronika legújabb eredményei", szerk.: Heiner Zs. és Osvay K.,
ISBN 963 482 779 9, Szeged, 2006

A. Dér, S. Valkai, L. Fábián, P. Ormos, J.J. Ramsden, E.K. Wolff
Integrated optical switching based on the protein bacteriorhodopsin
Photochem. Photobiol. 83: 393-396 (2007)

A. Hámori, M. Serényi, A. Dér, K. Ferencz, S. Kökényesi
All-optical switching possibilities for optical packet switching
Proceedings of the European Microwave Association 4: 221–225 (2008)

C) szabadalmi beadvány:

A. Dér, S. Valkai, P. P. Ormos and E.K. Wolff
Sensor Device (2008)
Hungarian patent application, P0800733